



PCT

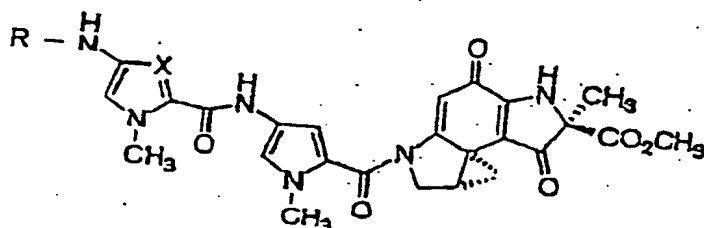
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07D 487/08, A61K 31/40, 31/415, 48/00, C12N 15/01</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/15641</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月23日(23.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01228</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月12日(12.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/260710 1998年9月14日(14.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 杉山 弘(SUGIYAMA, Hiroshi)[JP/JP] 〒162-0842 東京都新宿区市谷砂土原町3-17-1-1-303 Tokyo, (JP)</p> <p>陶 志福(TAO, Zhi Fu)[CN/JP] 〒135-0004 東京都江東区森下4-17-13-502 Tokyo, (JP)</p> <p>斎藤 烈(SAITO, Isao)[JP/JP] 〒607-8242 京都府京都市山科区勸修寺柴山1-21 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 JP, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: COMPOUNDS ALKYLATING SPECIFIC BASE SEQUENCE OF DNA AND METHOD FOR SYNTHESIZING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 DNAの特定塩基配列をアルキル化する化合物及びその合成法</p> <div data-bbox="337 1333 1169 1528"> <p>(I)</p> </div> <p>(57) Abstract Compounds capable of recognizing a minor group in a hydrogen bond of base pairs and covalently binding to a base. These compounds recognize a specific base sequence and strongly bind to the adjacent base via a covalent bond, thus regulating the expression of a gene carrying the above base sequence. The above compounds are represented by general formula (I), wherein R represents lower amyl or polyamido; and X represents nitrogen or CH. Agents for alkylating genes which contain the above compounds.</p>		

(57)要約

本発明は、塩基対の水素結合のマイナーグループを認識すると共に、塩基と共有結合をし得る化合物を提供する。本発明の化合物は、特定の塩基配列を認識すると共に、隣接する塩基と共有結合により強固に結合し、当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御することができる。

本発明は、次式 (I)



(式中、Rは低級アミル基又はポリアミド基を示し、Xは窒素原子又はCHを示す。)

で表される化合物に関する。また、本発明は、前記一般式 (I) で表される化合物からなる遺伝子のアルキル化剤に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	CR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

DNAの特定塩基配列をアルキル化する化合物及びその合成法

技術分野

本発明は、遺伝子をアルキル化することができる化合物、その化合物を用いたアルキル化剤、そのアルキル化剤を用いて遺伝子の発現を制御する方法、及び、当該化合物を含有してなる医薬組成物に関する。

背景技術

分子生物学の急速な進歩により、癌をはじめさまざまな疾病の原因がDNAの変異であることが次つぎと明らかにされてきている。また、ヒューマンゲノムプロジェクトによりヒトDNAの全塩基配列の決定も数年以内に完了するものとみられ、これら疾病の分子レベルの理解に基づいた治療法の出現がますます望まれてきている。しかし細胞の外から遺伝子の発現を制御する一般的な方法論が確立していないことが、このようなアプローチの実現の大きな壁になっている。最近、ディスタマイシンなどの抗生物質によるDNAの分子認識をヒントとして、塩基配列特異的に結合する分子が設計され、遺伝子発現の制御が可能になってきた。

三日月型をしたディスタマイシン、ネトロブシンなどの抗生物質が、DNAのアデニン・チミン（A・T）塩基対に富む配列のA-T間の水素結合のマイナーグループに結合することがX線結晶構造解析やNMRにより明らかにされ、この認識を利用したさまざまな分子が合成されてきた。ピロール環をイミダゾールに変えることにより、グアニン・シトシン（G・C）塩基対を認識するように改変できることについては以前から予想されていたが（M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1376, (1985)）；（J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward, J. C. Dabrowski, Biochemistry, 25, 7408 (1986).）、実際にはそう単純ではなく、多くの混沌とした実験結果が得られていた。

Wemmerらは、ディスタマイシンによるDNAへの結合についてNMRを

用いて詳細に検討した。その結果、これまで1枚しか収容されないと考えられていたDNAマイナーグループにディスタマイシンが2枚入りうることを示した

(J. G. Pelton, D. E. Wemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5723(1989).)。D e r v a nらはこのような結合モードを考慮すると、いままでの混沌とした結果が説明できることに着目し、アンチパラレルに配向したメチルピロール (Py)、メチルイミダゾール (Im) ポリアミドのペアにより2本鎖DNAの塩基配列が認識できることを見いだした。

すなわち、Py-ImによりC-G塩基対が、Im-PyによりG-C塩基対が、Py-PyによりA-TまたはT-A塩基対を認識するという一般則を導きだしたのである (S. White, E. E. Baird, P. B. Dervan, Chemistry&Biology, 4, 569(1997).)。ペアに共有結合を導入して、結合におけるエントロピー損失を防ぎ、より強い結合と認識能を得るためいろいろなヘアピンや環状のポリアミドが合成された。なかでもγリンカー(-NHCH₂CH₂CH₂CO-)をもつヘアピンがすぐれた結合能と認識能をもつことが示され、そのDNAとの複合体の構造も決定されている (R. P. L. de Clairac, B. H. Geierstanger, M. Marksich, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, J. Am. Chem. Soc., 119, 7909(1997).)。

また、ピロールイミダゾールのみでつくられるヘアピンポリアミドでは認識可能な配列は7塩基対が上限であるが (J. M. Turner, E. F. Baird, P. B. Dervan, *ibid.*, 119, 7636(1997).)、ホモダイマーを用いた系においてA・T配列を認識するβ-アラニン-ペアの導入で11塩基対の認識も可能になっている (S. E. Swalley, E. E. Baird, D. B. Dervan, Chem. Enr. J, 3, 1600(1997))。

さらに、D e r v a n、G o t t e s f e l dらはZnフィンガータンパクであるTFIIIAの認識配列中の4番目のフィンガーの結合配列のマイナーグループに拮抗して結合するポリアミドを設計し5SRNAの発現が*in vitro*の実験において選択的に制御されることを示した (J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, Nature, 387, 202(1997).)。また、同時に*in vitro*の実験において、ポリアミドが核内に透過していることも示された。

近年、遺伝子の制御に関して、オリゴヌクレオチドやペプチド核酸 (PNA) などが注目されているが、細胞透過性が問題となっていることを考えると、これ

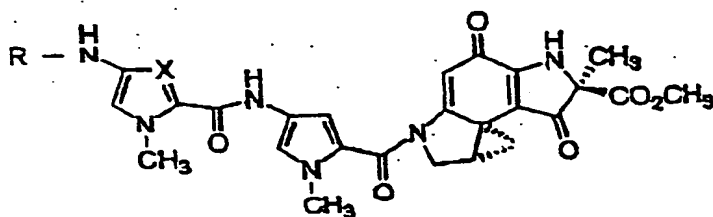
らメチルピロール-メチルイミダゾールポリアミドは遺伝子発現を制御する分子として、分子生物学の道具として、さらには医薬としても期待がもてる化合物であることが示されてきた。

従来のPy-Im系のポリアミドは、塩基対の水素結合のマイナーグループを認識するだけであり、遺伝子と共有結合するものではなかった。

本発明は、塩基対の水素結合のマイナーグループを認識すると共に、塩基と共有結合をし得る化合物を提供する。本発明の化合物は、特定の塩基配列を認識すると共に、隣接する塩基と共有結合により強固に結合し、当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御することができる。

発明の開示

本発明は、次式 (I)



(式中、Rは低級アシル基又はポリアミド基を示し、Xは窒素原子又はCHを示す。)

で表される化合物に関する。

また、本発明は、前記一般式 (I) で表される化合物からなる遺伝子のアルキル化剤に関する。より詳細には、本発明のアルキル化剤は、遺伝子中の特異的な塩基配列、W-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。) 又はG-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。) などの配列を認識して当該部分を選択的にアルキル化することができるものである。

さらに、本発明は、前記のアルキル化剤を用いて、遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分の発現を制御する方法に関する。

また、本発明は、前記一般式 (I) で表される化合物を含有してなる、遺伝子

により誘発され得る疾患を治療又は予防するための医薬組成物にも関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物の製造方法を例示したものである。

第2図は、IPDu-Distによるアルキル化の反応性、ミスマッチのものは反応性が低い。

第3図は、PPDuによるアルキル化の反応性、ミスマッチのものは反応性が低い。

第4図は、IPDu及びPPDuによるDNAフラグメント(I I')を用いた配列の認識を示す。

第5図は、IPDu及びPPDuによるDNAフラグメント(I')及び(I I')を用いた配列の認識を示す。

第6図は、IPDu-Dist-8量体複合体のエレクトロスプレー質量分析によるスペクトルチャートを示す。

第7図は、本発明の化合物の好ましいものの例示である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の一般式(I)におけるRの低級アシル基としては、カルボニル基の炭素原子を含めて炭素数1~12、好ましくは2~6の低級アシル基であり、例えば、アセチル基、プロピオニル基、イソプロピオニル基、ブタノイル基などが挙げられるが、立体的に小さなもののほうが好ましい。

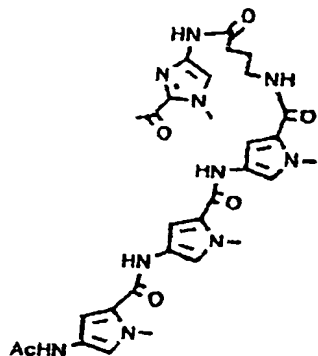
また、Rのポリアミド基としては、N-メチル-4-アミノ-2-カルボキシピロール(HO-Py-H)、N-メチル-4-アミノ-2-カルボキシイミダゾール(HO-Im-H)、N-メチル-4-アミノ-3-ヒドロキシ-2-カルボキシピロール(HO-Hp-H)、4-アミノ酪酸(HO-γ-H)(γ-リンカー用)などのアミノカルボン酸からなるポリアミドが挙げられる。これらのポリアミドのアミド基の窒素-水素結合の部位が、遺伝子の塩基を認識し、即ち、一般的にはPy-ImはC-G対を認識し、Im-PyはG-C対を認識し、Py-PyはA-T対又はT-A対を認識することから、認識させたい塩基配列

に応じて、前記ポリアミドを設計することができる。

Rにおけるポリアミドのアミド基は、遺伝子の塩基対の片側に対して5～7個、好ましくは3個までのものが好ましく、それ以上のアミド基を有することもできるが、塩基配列に対する親和性の向上を期待することは難しい。好ましいポリアミド基としては、N-メチル-4-アセチルアミノ-イミダゾール-2-カルボニル基が挙げられる。

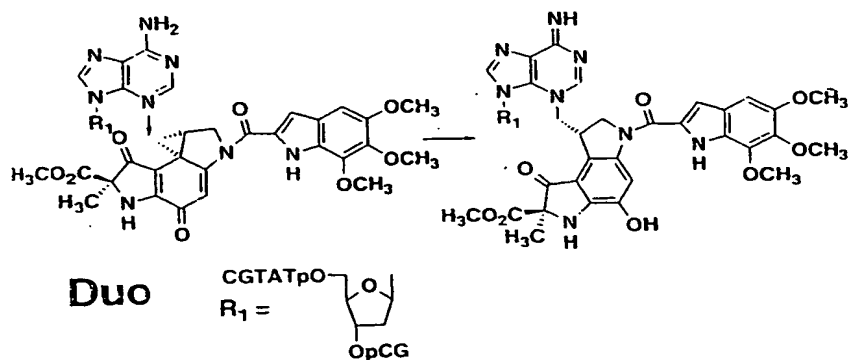
Rにおけるポリアミド基中のγ-アミノ酪酸部分は、γ-リンカーとして作用するものであり、この部分でポリアミド鎖がヘアピンカーブして、遺伝子の塩基対の対になっている塩基配列を認識することになる。

本発明の一般式(I)におけるRのポリアミド基としては、次式



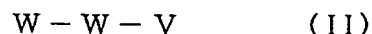
で示されるものが好ましい。

本発明の一般式(I)で表される化合物のアルキル化部分は、次式で示されるデュオカルマイシンA (Duocarmycin A) のアルキル化機構と同様な機構でアルキル化する。



しかしながら、デュオカルマイシンAのアルキル化はアデニン(A)のプリン環でのみ生起するのに対して、本発明の化合物のアルキル化はアデニン(A)又は(G)のいずれのプリン環においても生起する点で相違がある。

本発明の化合物のアミド結合に続く $P y - P y -$ の部分は、遺伝子の塩基配列 $W - W$ (W は、 A 若しくは T 又は U を示す。)を認識配列とし、 $I m - P y -$ の部分は遺伝子の塩基配列の $G - W$ (W は、 A 若しくは T 又は U を示す。)を認識配列としている。したがって、本発明の化合物は次式 (II) 又は (III)



(式中、 V は A 又は G 、 W は A 若しくは T 又は U を示す。)

の塩基配列を認識し、塩基 V (A 又は G) の部分で遺伝子と共有結合を形成するものである。

しかしながら、本発明のアルキル化剤はこれらの塩基配列に制限されるものではなく、前述したように標的とする塩基配列を必要に応じて設計することができる。

また、前述した R の部分において、さらにポリアミド結合を延ばすことにより、認識できる塩基配列をさらに延ばすことができる。

本発明の一般式 (I) で表される化合物は、例えば、第1図 (第1図は、 R がアセチル基の場合を示す。) に示す方法で製造することができる。本発明の化合物のアルキル化部分は、デュオカルマイシン $B 2$ ($D u o \quad B 2$) を原料として第1図に示す方法により製造でき、これを別に製造されたピロールカルボン酸誘導体を用いてアシド化することにより製造される。より具体的な製造例を後述する実施例において例示する。

本発明の化合物のひとつである X が窒素原子で R がアセチル基の化合物 (以下、 $I P D u$ という。) を用いて、8塩基の種々のオリゴヌクレオチドとの認識をした結果を第2図に示す。第2図に示す試験は、本発明の化合物 $I P D u$ とディスタマイシンを使用したものであり、本発明の化合物を $- \bullet - \bigcirc - \Delta$ で示し、ディスタマイシンを $+) - \diamond - \bigcirc - \bigcirc - \bigcirc$ で示している (図中では、 \bigcirc が灰色で示されている。)。そして、本発明の化合物の Δ 印で示されている部分で遺伝子と共有結合をしている。

前述したように、 $I P D u$ は $G - W - V$ (式中、 V は A 又は G 、 W は A 若しくは T 又は U を示す。) の塩基配列を認識するので、第2図中の4種のオリゴヌク

レオチドのうち、G-T-Gの塩基配列を有するもの（第2図中の左側部分の2種）及びG-A-Gの塩基配列を有するもの（第2図中の右下側のもの）は、その塩基配列を認識して効率よく共有結合するのに対して、前記した認識配列とは異なるA-T-Gの塩基配列を有するもの（第2図中の右上側のもの）はミスマッチとなり、反応が遅く、46時間経過後も8%程度に過ぎない。このように、本発明の化合物が完全に配列を認識していることが判る。

第2図の左下側に示されるオリゴヌクレオチドが最もよくマッチしており、このものをエレクトロスプレー質量分析で分析した結果を第6図に示す。この質量分析のスペクトルチャートから、本発明の化合物がDNAに共有結合していることが示された。

第3図は、前記同様に本発明のXがCHでRがアセチル基である化合物（以下、PPDuという。）を用いて試験をした結果を示すものである。

前述したように、PPDuはW-W-V（式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。）の塩基配列を認識するので、第3図中の4種のオリゴヌクレオチドのうち、T-T-Gの塩基配列を有するもの（第3図中の下側部分の2種）及びA-T-Gの塩基配列を有するもの（第3図中の左上側のもの）は、その塩基配列を認識して効率よく共有結合するのに対して、前記した認識配列とは異なるG-T-Gの塩基配列を有するもの（第3図中の右上側のもの）はミスマッチとなり、反応が遅く、22時間経過後も26%程度に過ぎない。このように、本発明の化合物が完全に配列を認識していることが判る。

第4図は、同様の試験を長鎖のDNAを用いて作った結果を示している。この試験に使用したDNAの全塩基配列は配列表の配列番号2に示されている。

第4図の右側はPPDuを用いた結合を、左側はIPDuを用いた場合を示している。第4図の右側においては、部分配列がW-W-Gである箇所において本発明のPPDuによるアルキル化が生起していることが判った。また、第4図の左側においては、部分配列がG-W-Gである箇所において本発明のPPDuによるアルキル化が生起していることが判った。

なお、第4図の試験においては、IPDu又はPPDuの濃度を、4、8、16、及び、32 μ Mの4段階で行っている（各濃度においてディスタマイシン

(D i s t) の濃度をそれぞれ 8、16、32、及び、64 μ M とした。) 。

第 5 図は、本発明の化合物として P y - P y - P y - r - I m - P y - P y - D u を用いて、392bp (I' DNA (配列表の配列番号 1 に示す。)) と 449bp (I I I' DNA (配列表の配列番号 3 に示す。)) を用いて前記と同様な試験をした結果を示すものである。

P P D u の認識配列である W - W - A の部分配列を有する部分においてアルキル化が生起しているスポットが観察できた。この試験においては、本発明の前記の化合物を濃度、0.25、0.5、1.0、及び、2.0 μ M の 4 段階で使用した。

以上の試験からも明らかなように、本発明の化合物は、遺伝子の特定の塩基配列の部分の特異的にアルキル化し、当該遺伝子の発現を阻害することができる。

即ち、本発明の化合物は、遺伝子の標的とする塩基配列の部分の特異的にアルキル化することができ、当該アルキル化により遺伝子の機能を阻害することにより、その発現を制御することができる。

第 7 図に本発明の好ましい化合物が例示されている。

また、本発明の化合物は、ピロールイミダゾール系のポリアミドであり、細胞透過性に優れており、生体へ通常の方法で投与することにより、標的の遺伝子を特異的に制御することができるものである。

したがって、本発明は、本発明の化合物を用いた遺伝子の特異的なアルキル化剤、それを用いた遺伝子の制御方法、及び、癌などの遺伝子に誘発される各種疾患を治療又は予防する医薬組成物を提供するものである。

実施例

次に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 : X が N で R がアセチル基の化合物の製造

(1) アルキル化部 (D u) の製造

窒素雰囲気下、デュオカルマイシンB₂の122mg (0.209mmol)をメタノール10mlとアセトニトリル10mlの混合物に溶解し、0℃に冷却し、これに28%ソディウムメトキシライドのメタノール溶液120μlを滴下した。反応混合物を0℃で11時間攪拌した後、35mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH5.3)を加えた。メタノールを留去し、食塩を加え、残渣を酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し濃縮した。濃縮物をカラムクロマトグラフィー(クロロホルム：アセトン=1：0～3：1)で精製した。44mgの黄色の生成物を得た(収率77%)。

¹H-NMR (CDCl₃) δ ;

6.06 (s, br, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.01 (s, br, 1H), 3.79 (m, 1H),
3.71 (s, 3H), 3.66 (d, J=11.0Hz, 1H), 3.01 (m, 1H),
2.04 (dd, J=3.7Hz, 1H), 1.61 (s, 3H),
1.00 (dd, J=3.7 and 4.9Hz, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ ;

193.64, 176.55, 174.95, 168.32, 166.84, 108.82, 98.65, 71.14,
53.21, 51.90, 30.49, 24.39, 22.60, 20.98

FABMS m/e 275 [M+1]

(2) Im-Pyの製造

(a) 窒素雰囲気下、4mlの無水酢酸に、4-アミノ-N-メチルイミダゾール-2-イル-カルボン酸エチルエステル塩酸塩3.025g (14.7mmol)とピリジン10ml及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)15mlの混合物を加えた。反応混合物を1時間室温で攪拌し、約15mlに濃縮した。100mlの水を加えた後、混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、-30℃に冷却して、目的のN-アセチル体2.64gを得た(収率85%)。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ;

10.55 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 4.25 (q, J=7.0Hz, 2H), 3.89 (s, 3H),
1.97 (s, 3H), 1.28 (t, J=7.0Hz, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

167.00, 158.43, 137.58, 130.77, 114.62, 60.47, 35.32, 22.60,
14.02

HREIMS m/e $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ 計算値 : 211.0957

実測値 : 211.0960

(b) 前記の (a) で得られたアセチル体 0.950 g (4.50 mmol) を 16 ml のメタノール中にとり、2 N-NaOH 16 ml を加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌した。メタノールを留去し、残った水溶液を4℃に冷却し、1 N-HCl をもちいて pH 2 に調整した。沈殿物を集め水で洗浄し、乾燥して遊離カルボン酸 0.763 g を白色固体として得た (収率 93%)。

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

10.45 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)

HREIMS m/e $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ 計算値 : 183.0644

実測値 : 183.0666

(c) 前記の (b) で得られた遊離カルボン酸体 0.551 g (3.01 mmol) の 30 ml DMF 溶液に、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 0.488 g (3.61 mmol) とジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 0.744 g (3.61 mmol) の混合物を加えた。混合物を室温で40時間攪拌した後、メチル 4-アミノ-1-メチルピロール-2-カルボン酸エステル塩酸塩 0.574 g (3.01 mmol) と DMF 10 ml 及び 15 ml の DIEA の混合物を加えた。混合物を室温で4日間攪拌した。濾過して、DMF を留去し、200 ml の酢酸エチルを加えた。濾過して沈殿物を除き、酢酸エチル溶液を 1 N 塩酸で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、-30℃に冷却して、目的のアミド-メチルエステル体 0.522 g を得た (収率 54%)。

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

10.19 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.50 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H),
6.68 (d, J=1.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (s, 3H),

2.01 (s, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

167.24, 160.73, 155.86, 136.15, 133.78, 121.99, 120.95, 118.78,
114.01, 108.69, 50.93, 36.23, 34.88, 22.69,

HREIMS m/e $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ 計算値: 319.1280

実測値: 319.1277

(d) 前記の (c) で得られたアミド-メチルエステル体 0.500 g をメタノール 12.5 ml に溶解し、12.5 ml の 2N-NaOH を加えた。その溶液を室温で終夜攪拌した。メタノールを留去し、水 20 ml を加え濾過し、得られた水溶液を 1N 塩酸で pH 2 に調整した。沈殿物を集め乾燥して、目的の遊離カルボン酸体 0.439 g を得た (収率 92%)。

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

12.18 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.45 (s, 1H),
7.40 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H),
3.34 (s, 3H), 2.01 (s, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

167.23, 161.86, 155.79, 136.15, 133.83, 121.69, 120.42, 119.82,
113.94, 108.74, 36.18, 34.88, 22.69,

HREIMS m/e $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$ 計算値: 305.1124

実測値: 305.1123

(e) 前記の (d) で得られた遊離カルボン酸体 0.135 g (0.44 mmol) と 1,1'-カルボニルジイミダゾール 84 mg を 5 ml の DMF に溶解した。室温で 5 時間攪拌した後、反応混合物を 100 ml の冷水に注いだ。沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空で乾燥し、目的の活性アミド体 0.108 g を得た (収率 69%)。

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

10.18 (s, 2H), 8.24 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.68 (s, 1H),

7.43(s, 1H), 7.13(s, 1H), 7.10(d, J=1.9Hz, 1H), 3.94(s, 3H),
3.90(s, 3H), 2.02(s, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

167.28, 156.76, 156.02, 137.76, 136.18, 133.50, 129.75, 124.42,
122.94, 119.90, 118.52, 114.34, 112.13, 36.32, 34.96, 22.70

HREIMS m/e $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}$, 計算値: 355.1393

実測値: 355.1402

(3) アミド化

前記の(1)で得られた化合物19.4mg (0.071mmol)の0.5ml DMF溶液に、窒素雰囲気下、 -40°C で60%水素化ナトリウム7.2mg (0.180mmol)の0.5ml DMF溶液を滴下した。混合物を -40°C ~ -20°C で2.5時間攪拌した後、 -50°C に冷却し、前記(2)(e)で得られた活性アミド体41.8mg (0.118mmol)の1.0ml DMF溶液を滴下した。反応混合物を -50°C ~ -30°C で3時間攪拌した。冷たい0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)の20mlを添加した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、残渣をTLCで酢酸エチルを用いて溶出して、目的のIPDu15.1mgを得た(収率34%)。

^1H -NMR (CDCl_3) δ ;

8.68(s, 1H), 7.68(s, br, 1H), 7.33(s, 1H), 7.31(s, 1H),
6.51(d, J=1.81Hz, 1H), 6.43(s, 1H), 6.10(s, br, 1H),
4.20(dd, J=5.5 and 4.9Hz, 1H), 4.02(d, J=11.6Hz, 1H),
3.98(s, 3H), 3.78(s, 3H), 3.67(s, 3H), 2.86(m, 1H),
2.21(dd, J=3.7Hz, 1H), 2.10(s, 3H), 1.59(s, 3H),
1.24(t, J=4.3Hz, 1H)

HRFABMS m/e 562.2054 [M+H]

($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}$, とした計算値: 562.2050)

実施例2: XがCHで、Rがアセチル基の化合物の製造

(1) Py-Py の製造

(a) 実施例 1 の (2) の (a) と同様にしてピロール誘導体を得た (収率 91 %)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ;

7.79 (s, 1H), 7.26 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.60 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H),

3.78 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ ;

166.52, 160.70, 122.81, 120.28, 118.56, 107.58, 50.87, 36.06,

22.95

HREIMS m/e $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ 計算値 : 196.0848

実測値 : 196.0837

(b) 実施例 1 の (2) の (b) と同様にしてピロール誘導体を得た (収率 84 %)。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ ;

9.80 (s, 1H), 7.24 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.62 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H),

3.77 (s, 3H), 1.93 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ ;

166.49, 161.83, 122.53, 119.83, 119.57, 107.61, 36.06, 22.95

HREIMS m/e $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ 計算値 : 182.0691

実測値 : 182.0682

(c) 実施例 1 の (2) の (c) と同様にしてピロール誘導体を得た (収率 51 %)。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ ;

9.87 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.43 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H),

7.12 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.82 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H),

3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 1.95 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ ;

166.42, 160.74, 158.36, 122.84, 122.45, 122.13, 120.70, 118.48

118.12, 108.36, 103.84, 50.87, 36.08, 36.00, 22.98

HREIMS m/e $C_{15}H_{18}N_4O_4$ 計算値: 318.1328

実測値: 318.1310

(d) 実施例1の(2)の(d)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率87%)。

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

9.83(s, 1H), 9.79(s, 1H), 7.39(d, J=2.0Hz, 1H),

7.12(d, J=2.0Hz, 1H), 6.82(dd, J=2.0 and 1.5Hz, 2H),

3.80(s, 6H), 1.96(s, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

166.42, 161.88, 158.33, 122.53(d), 122.12, 120.24, 119.47,

118.05, 108.36, 103.82, 36.04, 35.98, 23.00

HREIMS m/e $C_{14}H_{16}N_5O_4$ 計算値: 304.1171

実測値: 304.1167

(e) 実施例1の(2)の(e)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率74%)。

1H -NMR (DMSO- d_6) δ ;

9.98(s, 1H), 9.80(s, 1H), 8.25(s, 1H), 7.75(d, J=1.5Hz, 1H),

7.68(t, J=2.0 and 1.0Hz, 1H), 7.13(t, J=2.0 and 1.0Hz, 2H),

6.93(d, J=1.5Hz, 1H), 6.88(d, J=1.5Hz, 1H), 3.90(s, 3H),

3.82(s, 3H), 1.96(s, 3H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ ;

166.47, 158.46, 156.75, 137.70, 129.67, 124.32, 123.88, 122.25,

122.13, 119.68, 118.56, 118.40, 111.69, 104.04, 36.23, 36.10,

23.02

HREIMS m/e $C_{17}H_{18}N_6O_3$ 計算値: 354.1440

実測値 : 3 5 4 . 1 4 4 2

(2) アミド化

実施例 1 の (3) と同様にしてピロール誘導体 PPDu を得た (収率 26%)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ;

8.28 (s, br, 1H), 7.78 (s, br, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.94 (s, 1H),
6.64 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.39 (s, 1H),
4.20 (dd, $J=5.5$ and 4.9Hz , 1H), 4.00 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H),
3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.90-2.86 (m, 1H),
2.21 (dd, $J=3.7\text{Hz}$, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.23 (s, 3H),
0.86 (t, $J=4.3\text{Hz}$, 1H)

HRFABMS m/e 561.2089 [M+H]

($\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_7$ とした計算値 : 561.2098)

実施例 3 : アルキル化の試験

DNA 8 量体を DNA 自動合成機で合成した。DNA オリゴヌクレオチドのアルキル化は次のようにして行った。本発明の化合物 (0.1 mM)、ディスタマイシン A (0.1 mmol) 及び DNA 8 量体 (1 mM) を 50 mM の炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に加え、0℃で種々の時間インキュベートした。反応を HPLC (ケムコポンド 5-ODS-H カラム) でモニターした。溶出液は 0.05 M ギ酸アンモニウムと 0~50% アセトニトリルのリニアな傾斜 (0~40 分) で、流量は 1.0 ml/分であった。254 nm で検出した。

本発明の IPDu を用いた場合の結果を第 2 図に示す。

本発明の PPDu を用いた場合の結果を第 3 図に示す。

実施例 4 : IPDu 及び PPDu による長鎖 DNA のアルキル化の試験

5'-テキサス レッド-エンド-モディファイド 450 bp DNA を PCR 法により調製した。5'-テキサス レッド-エンド-モディファイド pUC 18 の 378~395 及び pUC 18 の逆の 1861~1881 を用いた。

実施例 3 と同様にしてアルキル化の試験をした。

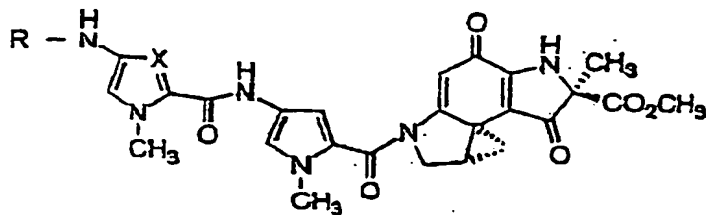
結果を第 4 図及び第 5 図に示す。

産業上の利用可能性

本発明は、特定の塩基配列を特異的にアルキル化することができる化合物を提供する。本発明の化合物は、遺伝子中の標的とした塩基配列に選択的かつ特異的にアルキル化することができ、これにより当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御し、遺伝子が誘発する各種疾患の治療・予防などに有用である。

請 求 の 範 囲

1. 次式 (I)



(式中、Rは低級アシル基又はポリアミド基を示し、Xは窒素原子又はCHを示す。)

で表される化合物。

2. Rがアセチル基である請求の範囲第1項に記載の化合物。

3. RがN-メチルピロール環及び／又はN-メチルイミダゾール環を含有するポリアミド基である請求の範囲第1項に記載の化合物。

4. Rが、基-CO-(CH₂)₃-NH-で示されるγ-リンカーを含有している請求の範囲第3項に記載の化合物。

5. 請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の化合物からなる遺伝子のアルキル化剤。

6. アルキル化のために認識される塩基配列が、W-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)又はG-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)である請求の範囲第5項に記載のアルキル化剤。

7. さらに、ディスタマイシンと組み合わせて使用されることを特徴とする請求の範囲第5項又は第6項に記載のアルキル化剤。

8. 請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の化合物からなる遺伝子のアルキル化剤を製造する方法。

9. アルキル化のために認識される塩基配列が、W-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)又はG-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)である請求の範囲第8項に記載のアルキル化

剤を製造する方法。

10. さらに、ディスタマイシンと組み合わせて使用されることを特徴とする請求の範囲第8項又は第9項に記載のアルキル化剤を製造する方法。

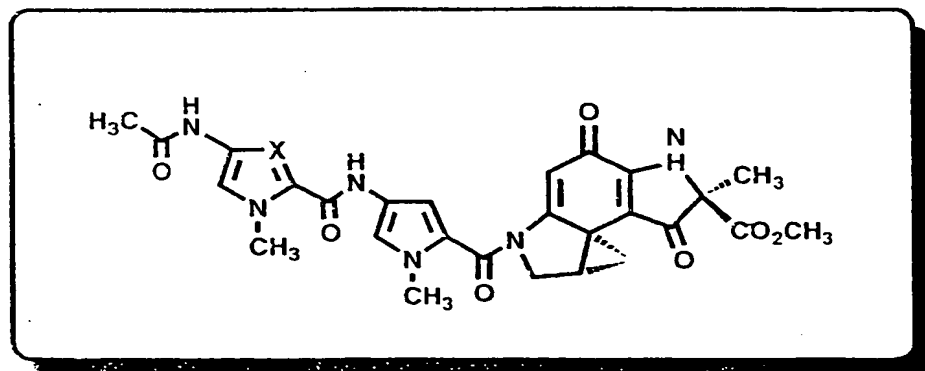
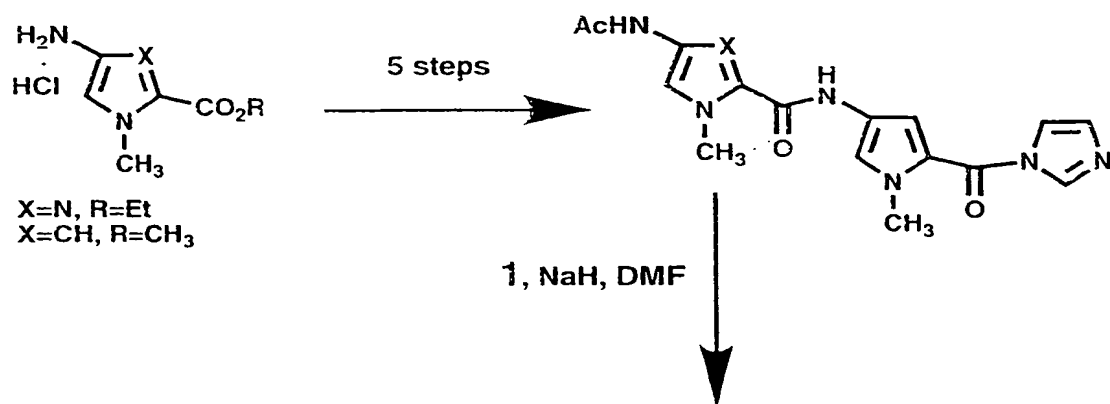
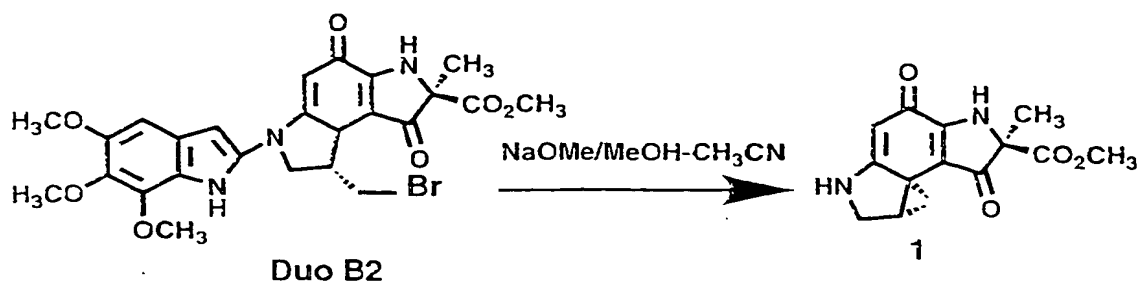
11. 請求の範囲第5～7項のいずれかに記載のアルキル化剤を用いて、遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分の発現を制御する方法。

12. 遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分が、生物の疾患を誘発する遺伝子である請求項11に記載の方法。

13. 生物の疾患を誘発する遺伝子が、癌遺伝子である請求の範囲第12項に記載の方法。

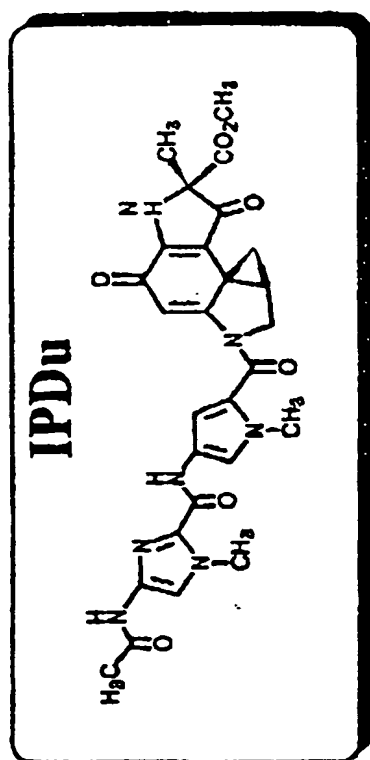
14. 請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の化合物を含有してなる、遺伝子により誘発され得る疾患を治療又は予防するための医薬組成物。

第 1 図



IPDu: X=N

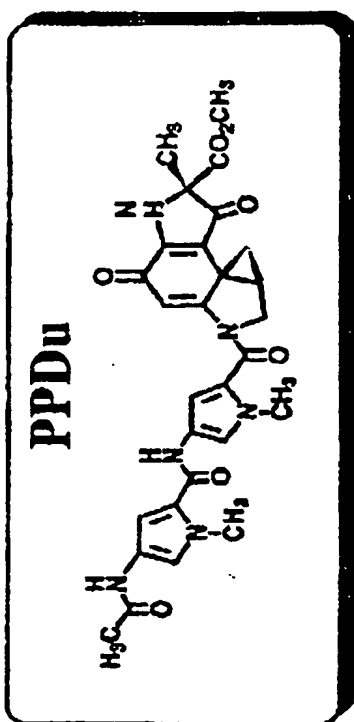
PPDu: X=CH



第 2 図

5'-C A G T G G T-3'	match	5'-C A G A T G G T-3'	mismatch
	8.9% (5min)		0% (5min)
	11% (1h)		0% (1h)
	21% (5h)		1.8% (5h)
	42% (22h)		7.1% (22h)
	72% (46h)		8.0% (46h)

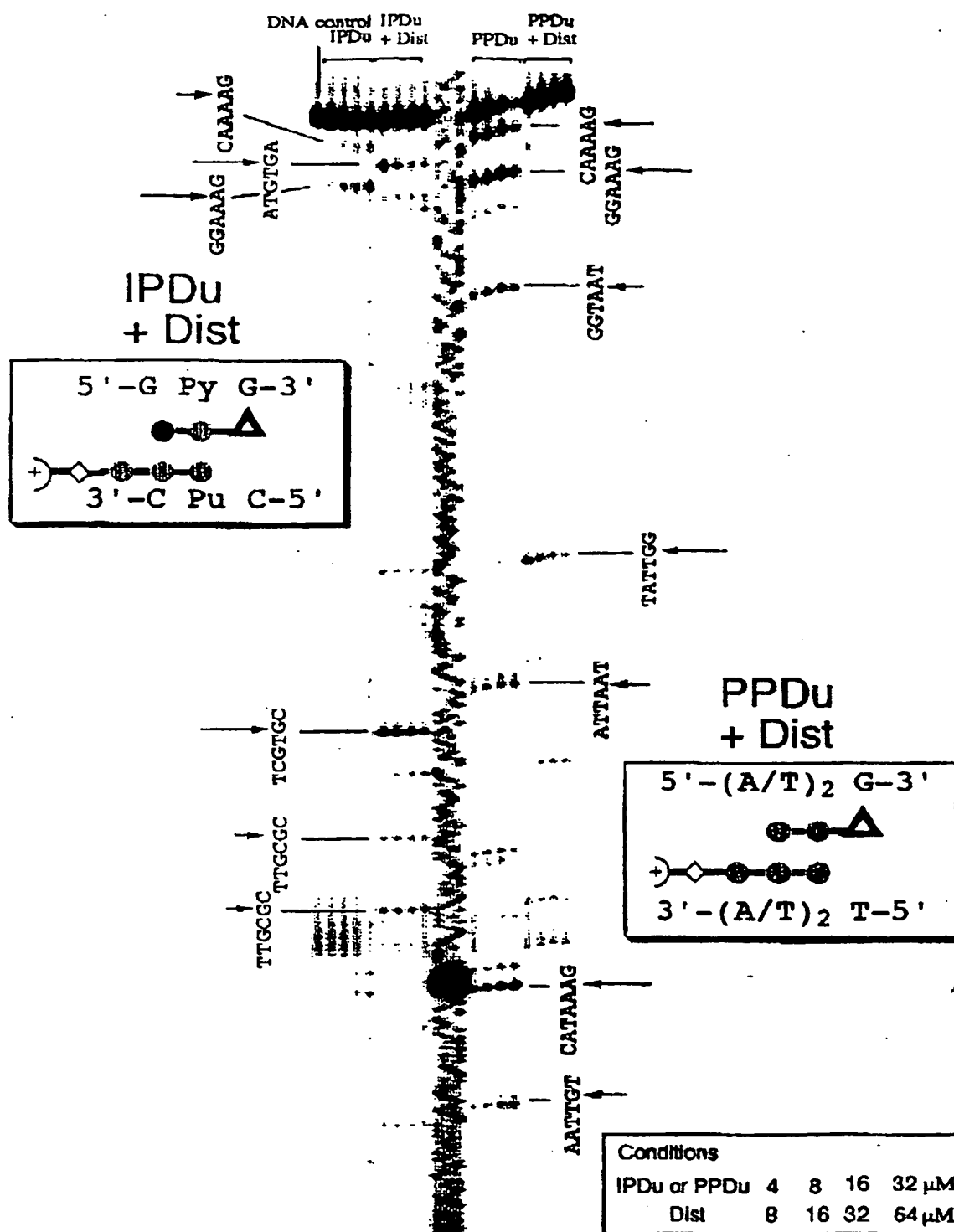
[illegible]



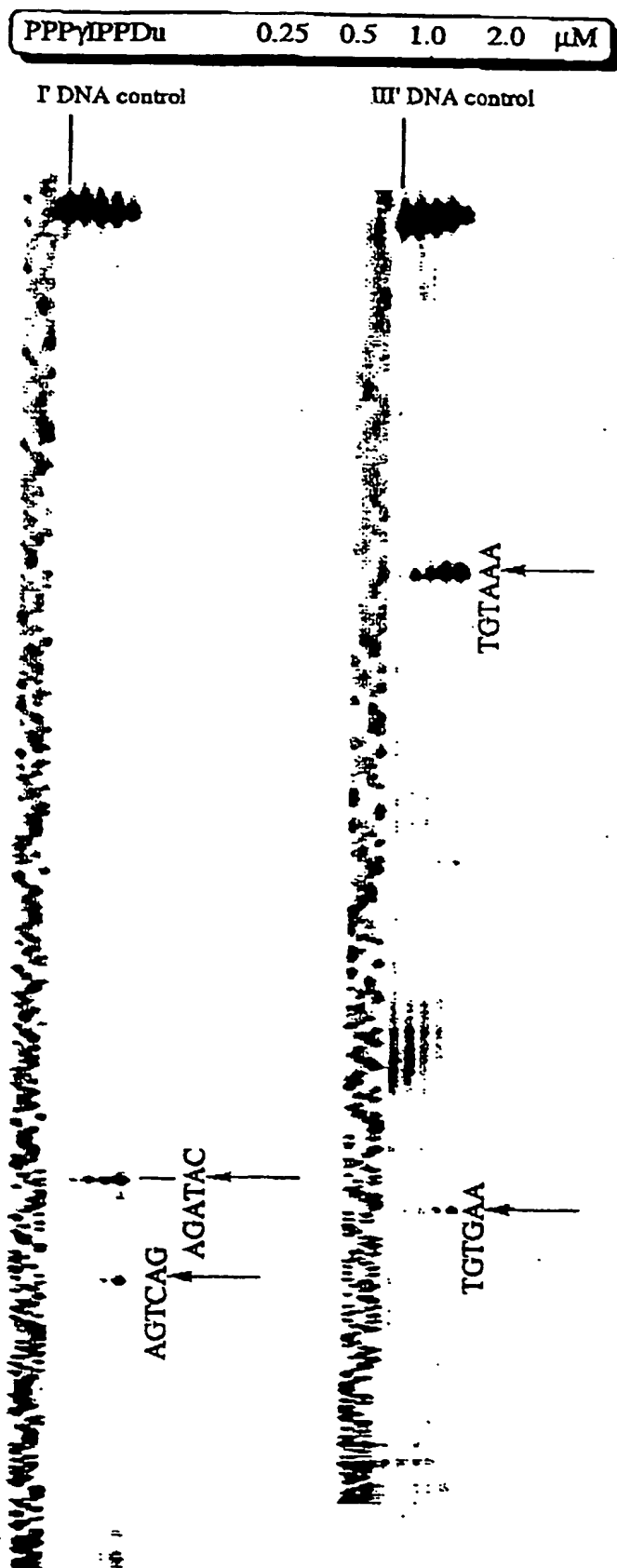
		match	5'-C A G G T G T-3'	5'-C A G G T G T-3'	mismatch	3
	+)	6.8% (5min)	3'-G T C T A C C A-5'	3'-G T C C A C C A-5'	0.7% (5min)	
		17% (1h)			3.7% (1h)	
		46% (5h)			12% (5h)	
		83% (22h)			26% (22h)	

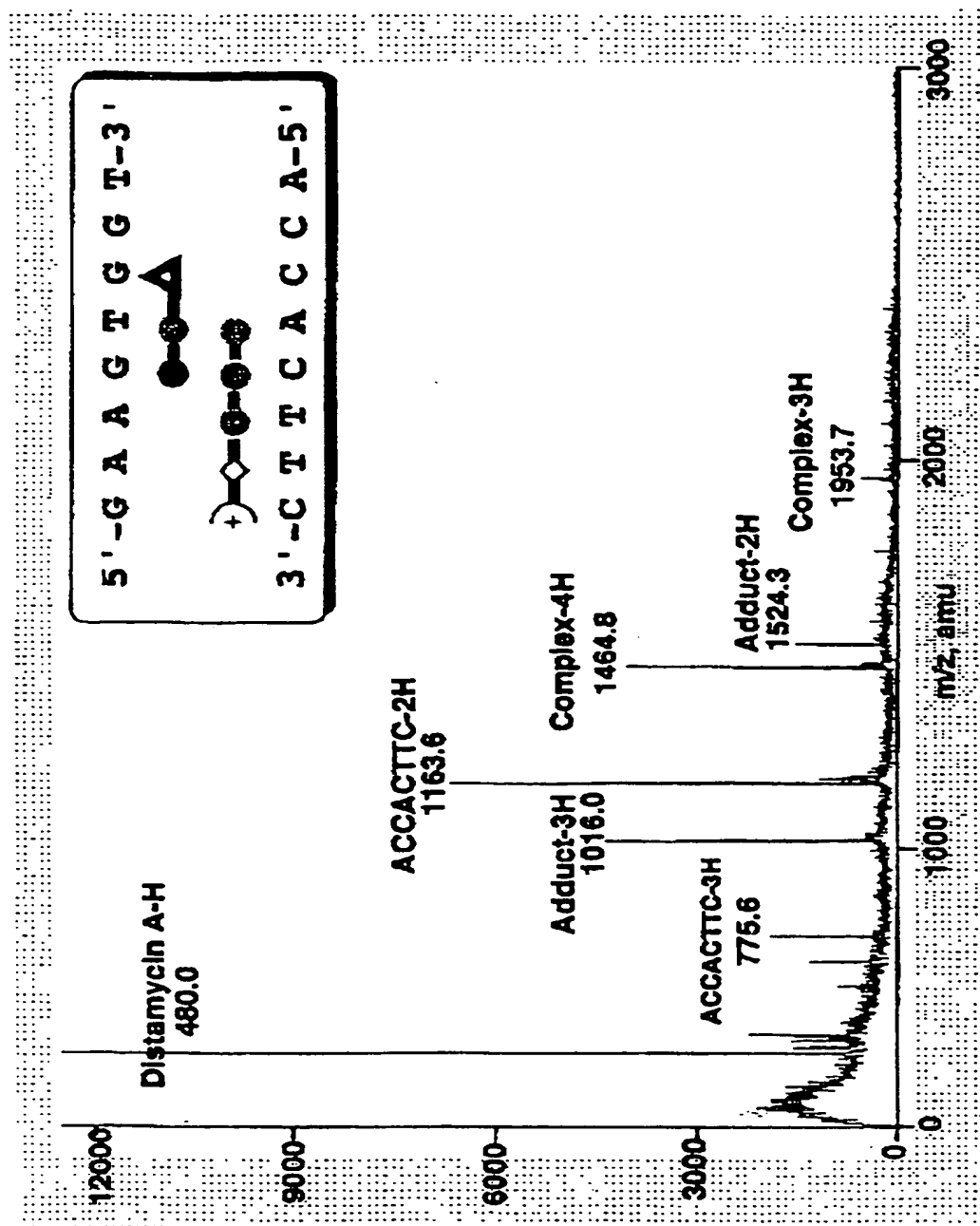
		match	5'-C A G T T G G T-3'	5'-C A C T T G G T-3'	match	3
	+)	2.6% (5min)	5'-G T C A A C C A-3'	5'-G T G A A C C A-3'	19% (5min)	
		10% (1h)			27% (1h)	
		32% (5h)			44% (5h)	
		57% (22H)			74% (22h)	

第 4 図

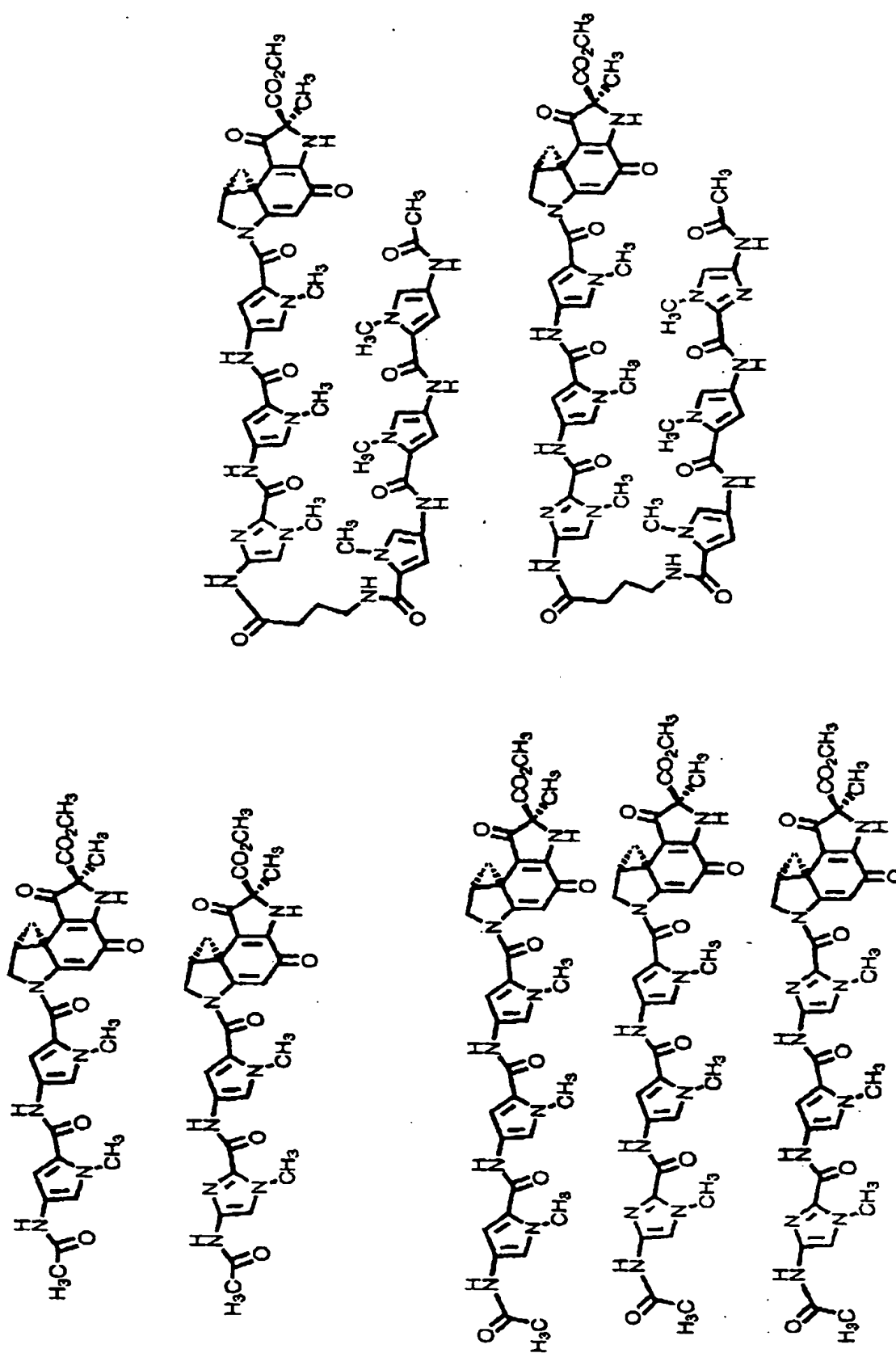


第 5 図





第 7 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> A compound to alkylate for the specific sequence in DNA and its method of preparation

<130> PA906342

<160> 3

<210> 1

<211> 450

<212> DNA

<213> pUC 18

<400> 1

```
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa      60
ccgtaaaaaag gccgcgttgc tggcgTTTTT ccataggctc cgcccccttg acgagcatca    120
caaaaatcga cgtcaagtc agaggTggcg aaaccgcaca ggactataaa galaccaggc      180
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgtc tctgttccg acctgccgc tiaccggata      240
cctgtccgcc ttctccccit cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta    300
tctcagttcg gtgtaggTcg ttgcctccaa gctgggcTgt gtgcacgaac cccccgttca    360
gcccgaccgc tgcgccttat ccgttaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga    420
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa                                     450
```

<210> 2

<211> 450

<212> DNA

<213> pUC 18

<400> 2

```

tglaaaacga cggccagtcg caagcttgca tgcctgcagg tcgacictag aggatccccg      60
ggtaaccgagc tcgaattcgt aatcaatggc atagctggtt cctgtgtgaa attgttaacc      120
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tglaaagcct ggggtgccta      180
atgagtgagc taactacat taattgcgtt gcgctcacig cccgctttcc agtcgggaaa      240
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat      300
tgggcgtctt tccgcttcc tgcctacatga ctgcctgcgc tcggctgttc ggctgcggcg      360
agcggtaatca gctcacitaa aggcggtaat acggttaacc acagaatcag gggataacgc      420
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca                                     450

```

<210> 3

<211> 426

<212> DNA

<213> pUC 18

<400> 3

```

ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc      60
gggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag      120
agtcacacat atgcgggtgt aaataccgca cagatgcgta aggagaaaa accgcatcag      180
gcgccattcg ccatcaggc tgcgcaacig ttgggaaggc cgtcgggtgc gggcctcttc      240
gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgcgtcaagg cgattaatgt gggtaacgcc      300
agggttttcc cagtcacgac gtgtglaaac gacggccagt gccaaagctt catgccigca      360
ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc gtaatcatgg tcatagctgt      420
ttcctg                                     426

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07D487/08, A61K31/40, 31/415, 48/00, C12N15/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07D487/08, A61K31/40, 31/415, 48/00, C12N15/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	TSUYOSHI FUJIWARA, ZHI-FU TAO, YOUHEI OZEKI, ISAO SAITO, HIROSHI SUGIYAMA, "Sequence selective DNA alkylation by duocarmycin derivatives using molecular recognition of pyrrole-imidazole polyamide", Nucleic Acids Symposium Series, 1998, No. 39, p.101-102	1-10, 14
A	HIROSHI SUGIYAMA, CHENYANG LIAN, MARIKO ISOMURA, ISAO SAITO, AND REW H.-J. WANG, "Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A", Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United states of America, 1996, Vol. 93, No. 25, p.14405-14410	1-10, 14
A	MARIKO ISOMURA, HIROSHI SUGIYAMA, ISAO SAITO, "Efficient guanine alkylation through cooperative heterodimeric formation of duocarmycin A and distamycin", Nucleic Acids Symposium Series, 1995, No. 34, p.47-48	1-10, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
26 April, 1999 (26. 04. 99)Date of mailing of the international search report
18 May, 1999 (18. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/01228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AKIHIKO OKAMOTO, AKIRA ASAI, HIROMITSU SAITO, MASAMI OKABE, KATSUSHIGE GOMI, "Differential Effect of Duocarmycin A and Its novel Derivative DU-86 on DNA Strand Breaks in HeLa S3 Cells", Japanese Journal of Cancer Research, 1994, Vol. 85, No. 12, p.1304-1311	1-10, 14
A	KOJI YAMAMOTO, HIROSHI SUGIYAMA, SHOUSUKE KAWAISHI, "Concerted DNA Recognition and Novel Site-Specific Alkylation by Duocarmycin A with Distamycin A", Biochemistry, 1993, Vol. 32, No. 4, p.1059-1066	1-10, 14
A	HIROSHI SUGIYAMA, KAZUSHIGE OHMORI, KIT LAM CHAN, MASAHIRO HOSODA, AKIRA ASAI, HIROMITSU SAITO, ISAO SAITO, "A NOVEL GUANINE N3 ALKYLATION BY ANTITUMOR ANTIBIOTIC DUOCARMYCIN A", Tetrahedron Letters, 1993, Vol. 34, No. 13, p.2179-2182	1-10, 14
A	AKIRA ASAI, SATORU NAGAMURA, HIROMITSU SAITO, "A Novel Property of Duocarmycin and Its Analogues for Covalent Reaction with DNA, 1994, Vol. 116, No. 10, p.4171-4177	1-10, 14
A	PAFAEL PELAEZ LAMAMIE DE CLAIRAC, BERNHARD H. GEIERSTANGER, MILAN MRKSICH, PETER B. DERVAN, DAVID E. WEMMER, "NMR Characterization of Hairpin Polyamide Complexes with the Minor Groove of DNA", 1997, Journal of the American Chemical Society, Vol, 119, No. 34, p.7909-7916	1-10, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01228

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] C07D487/08, A61K31/40, 31/415, 48/00, C12N15/01

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] C07D487/08, A61K31/40, 31/415, 48/00, C12N15/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	TSUYOSHI FUJIWARA, ZHI-FU TAO, YOUHEI OZEKI, ISAO SAITO, HIROSHI SUGIYAMA, "Sequence selective DNA alkylation by duocarmycin derivatives using molecular recognition of pyrrole-imidazole polyamide", Nucleic Acids Symposium Series, 1998, No. 39, p. 101-102	1-10, 14
A	HIROSHI SUGIYAMA, CHENYANG LIAN, MARIKO ISOMURA, ISAO SAITO, AND REW H.-J. WANG, "Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, Vol. 93, No. 25, p. 14405-14410	1-10, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行口若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.04.99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 P

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MARIKO ISOMURA, HIROSHI SUGIYAMA, ISAO SAITO, "Efficient guanine alkylation through cooperative heterodimeric formation of duocarmycin A and distamycin", Nucleic Acids Symposium Series, 1995, No. 34, p. 47-48	1-10, 14
A	AKIHIKO OKAMOTO, AKIRA ASAI, HIROMITSU SAITO, MASAMI OKABE, KATSUSHIGE GOMI, "Differential Effect of Duocarmycin A and Its novel Derivative DU-86 on DNA Strand Breaks in HeLa S3 Cells", Japanese Journal of Cancer Research, 1994, Vol. 85, No. 12, p. 1304-1311	1-10, 14
A	KOJI YAMAMOTO, HIROSHI SUGIYAMA, SHOUSUKE KAWAISHI, "Concerted DNA Recognition and Novel Site-Specific Alkylation by Duocarmycin A with Distamycin A", Biochemistry, 1993, Vol. 32, No. 4, p. 1059-1066	1-10, 14
A	HIROSHI SUGIYAMA, KAZUSHIGE OHMORI, KIT LAM CHAN, MASAHIRO HOSODA, AKIRA ASAI, HIROMITSU SAITO, ISAO SAITO, "A NOVEL GUANINE N3 ALKYLATION BY ANTITUMOR ANTIBIOTIC DUOCARMYCIN A", Tetrahedron Letters, 1993, Vol. 34, No. 13, p. 2179-2182	1-10, 14
A	AKIRA ASAI, SATORU NAGAMURA, HIROMITSU SAITO, "A Novel Property of Duocarmycin and Its Analogues for Covalent Reaction with DNA, 1994, Vol. 116, No. 10, p. 4171-4177	1-10, 14
A	PAFAEL PELAEZ LAMAMIE DE CLAIRAC, BERNHARD H. GEIERSTANGER, MILAN MRKSICH, PETER B. DERVAN, DAVID E. WEMMER, "NMR Characterization of Hairpin Polyamide Complexes with the Minor Groove of DNA", 1997, Journal of the American Chemical Society, Vol. 119, No. 34, p. 7909-7916	1-10, 14

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。